جداسازی انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین از نمونه های گوشت مرغ در اصفهان. ۱۳۹۸

فاتح رحیمی[1]*

۱- دکترای تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
***نشانی برای مکاتبه:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، بخش میکروبیولوژی
f.rahimi@sci.ui.ac.ir
دریافت مقاله: **آذر نود و نه** پذیرش برای چاپ: **بهمن نود و نه**

چکیده

سابقه و هدف: انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین معمولا در محیط بیمارستانها اندمیک هستند و میزان شیوع کلونیزاسیون آنها نیز همچنان در حال افزایش می باشد. انتروکوکها باکتریهای روده ای هستند که پستانداران، پرندگان، خزندگان و حشرات را کلونیزه می کنند. انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین به عنوان نخستین باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک با منشأ اولیه دامی شناخته می شوند. بنابراین، آلودگی غذا به ویژه گوشت و فرآورده های گوشتی با جدایه های *انتروکوکوس مقاوم* به ونکومایسین بسیار حائز اهمیت می باشد. هدف از این مطالعه بررسی حضور جدایه های *انتروکوکوس مقاوم* به ونکومایسین در نمونه های گوشت مرغ جمع آوری شده از فروشگاه های شهر اصفهان بود.

روش کار: در طی ماه های مهر لغایت آذر ۱۳۹۸ در مجموع ۱۲ نمونه گوشت مرغ از دو فروشگاه در شهر اصفهان تهیه شدند. تمامی نمونه های گوشت به صورت تازه و در بسته بندی اصلی جمع آوری شده و پس از فیلتراسیون، فیلترهای غشایی بر روی محیط mEnterococcus agar واجد ۸ میکروگرم/میلی لیتر ونکومایسین و سپس محیط بایل اسکولین آگار منقل شدند و کلنیهای سیاه رنگ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *ent* به عنوان جنس *انتروکوکوس* مورد تأیید قرار گرفتند. تمامی جدایه های انتروکوکی با استفاده از آزمون multiplex-PCR تا حد گونه مورد شناسایی قرار گرفتند و از آزمون multiplex-PCR دیگری به منظور بررسی حضور ژنوتایپهای *van*A-*van*G استفاده گردید.

یافته‌ها: در مجموع ۳۱۹ سویه *انتروکوکوس فیسیوم* مقاوم به ونکومایسین در میان تمامی نمونه های گوشت مورد شناسایی قرار گرفت. تمامی سویه ها واجد ژنوتایپ *van*A بودند و فراوانی ژنهای *van*B و *van*D در میان سویه ها به ترتیب ۱۳ و ۵ درصد بود. علاوه بر این، ۲ درصد سویه ها نیز واجد هر ۳ ژن مقاومت *van*A، *van*B و *van*D بودند و ژنهای *van*C، *van*E و *van*G در میان هیچکدام از سویه ها شناسایی نشدند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان دهنده شیوع بالای سویه های *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین در نمونه های گوشت مرغ در شهر اصفهان است که یک نگرانی برای سلامت عمومی محسوب می شود.

مقدمه

انتروکوکها به عنوان نرمال بیوتا دستگاه گوارش در انسان و حیوانات شناخته می شوند که معمولا مستقیما از طریق نمونه های مدفوعی یا از طریق فاضلاب وارد محیط شده و می توانند مدتهای طولانی در محیط باقی بمانند (۱). گونه های مختلف این باکتریها از اهمیت بالینی فراوانی جهت ایجاد عفونت برخوردار می باشند و از طرف دیگر استعداد و توانایی بالای اعضای مختلف این جنس آنها را به یک بیماریزای بسیار مهم مبدل نموده است. به همین دلیل اعضای این جنس یک هدف مناسب جهت بررسی روند ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی و فرآیند انتقال افقی ژن محسوب می شوند (۲، ۳). تاکنون حداقل بیش از بیست و شش گونه مختلف از جنس انتروکوکوس مورد شناسایی قرار گرفته است و این گونه ها در ۵ گروه دسته بندی شده اند که اعضای گروه ۲ از نظر بیماریزایی در انسان از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می باشند و شامل گونه بسیار مهم انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فیسیوم، انتروکوکوس گالیناروم، انتروکوکوس کسلی فلاووس و انتروکوکوس موندتی می باشند که

در این میان دو گونه فکالیس و فیسیوم بسیار حائز اهمیت هستند. در میان گونه های بیماریزا، انتروکوکوس فکالیس به عنوان عامل ایجاد ۹۰-۸۵ درصد عفونتهای انتروکوکی محسوب می شود و ۱۰-۵ درصد عفونتها نیز به انتروکوکوس فیسیوم نسبت داده می شود (۴). علاوه بر این، این باکتریها به عنوان عوامل ایجاد عفونتهای بیمارستانی در بخش مراقبتهای ویژه شناخته می شوند. به نظر می رسد که اعضای این جنس به دلیل داشتن مقاوت ذاتی نسبت به برخی از آنتی بیوتیکها و توانایی کسب مقاوت نسبت به بسیاری از عوامل ضدمیکروبی دیگر از قدرت بالایی جهت بقاء در محیط بیمارستان برخوردار می باشند (۵).

ونکومایسین از دسته آنتی بیوتیکهای گلیکوپپتایدی محسوب می شود که در منابع مختلف از آن به عنوان آخرین سلاح درمانی جهت درمان عفونتهای ناشی از باکتریهای گرم مثبت مقاوم به چند آنتی بیوتیک که واجد ساختار پنتاپپتایدی در ساختار دیواره می باشند نام برده می شود. در طی سالها، استفاده از برخی از آنتی بیوتیکها مانند آووپارسین به عنوان عامل افزایش دهنده رشد در دامها بسیار معمول بود و به نظر می رسد که این آنتی بیوتیک عامل پیدایش جدایه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در دامها و حیوانات اهلی باشد (۶). از آنجا که جدایه های مقاوم به ونکومایسین به راحتی از طریق مواد غذایی، فاضلاب و یا تماس مستقیم با کارگان شاغل در دامداریها و کشتارگاه ها به انسان نیز منتقل می شوند، بنابراین استفاده از آنتی بیوتیکها به عنوان عامل افزاینده رشد از سال ۱۹۹۷ در اتحادیه اروپا ممنوع گردید. مقاومت به ونکومایسین ناشی از وجود ۹ ژنوتایپ vanA، vanB، vanC، vanD، vanE، vanG، vanL، vanM و vanN می باشد که در این میان ژنوتایپ vanA از فراوانی بیشتری نسبت به سایر ژنوتایپها برخوردار است و جدایه های واجد این ژنوتایپ مقاومت بسیار بالایی را نسبت به ونکومایسین و تیکوپلانین از خود نشان می دهند (۳).

گوشت یکی از مواردی است که به راحتی در زمان حیات حیوان در دامداریها و مرغداریها، در طی زمان ذبح در کشتارگاه ها، در طی فرآیند حمل و نقل و یا در زمان عرضه در فروشگاه ها از طریق تماس با دست افراد می تواند دچار آلودگی با انواع مختلفی از باکتریها از قبیل انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین شود و بنابراین به راحتی به انسان نیز منتقل شود (۷). این باکتریها که خود از جمله منابع بسیار مهم ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی شناخته می شوند، به راحتی از طریق فرآیند انتقال افقی ژن باعث انتقال ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی به باکتریهای دستگاه گوارش انسان نیز می شوند (۳). بنابراین بررسی آلودگیهای نمونه های گوشتی به گونه های مختلف انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین بسیار حائز اهمیت می باشد. این مطالعه با هدف جداسازی گونه های مختلف انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین از نمونه های گوشت مرغ در شهر اصفهان و همچنین تعیین ژنوتایپهای مقاومت به ونکومایسین در میان این جدایه ها به انجام رسیده است.

روش کار

در این مطالعه در طی ۶ مرتبه نمونه گیری از دو فروشگاه عرضه کننده گوشت مرغ در شهر اصفهان در مهر ماه لغایت آذر ماه سال ۱۳۹۹، در مجموع ۱۲ نمونه گوشت بسته بندی شده مرغ (گوشت ران و سینه) جمع آوری شد و ضمن رعایت زنجیره سرد جهت بررسی به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل گردید. تمامی نمونه های جمع آوری شده پس از انتقال به آزمایشگاه با استفاده از دستورالعملی که در مطالعه پیشین مورد استفاده قرار گرفته بود در کمتر از ۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. (۸). به طور خلاصه، ۲۵ گرم از نمونه گوشت مورد بررسی به ارلن حاوی ۲۲۵ میلی لیتر محیط مولر هینتون براث (Merck, Darmstadt, Germany) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس، نمونه ها با استفاده از سیستم فیلتراسیون (Merck, Millipore, USA) فیلتر شدند و فیلترهای غشایی بر روی محیط اختصاصی mEnterococcus agar (Quelab, Montreal, Canada) واجد ونکومایسین (۸ میکروگرم/میلی لیتر) (Sigma-Aldrich, Germany) قرار گرفتند و پلیتهای واجد فیلتر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از ظهور کلنیهای قرمز رنگ فیلترهای غشایی به محیط بایل اسکولین آگار منتقل شده (Merck, Germany) و به مدت دو ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. کلنیهای سیاه رنگ به عنوان جدایه های مشکوک به انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین انتخاب شدند و پس از کشت بر روی محیط نوترینت آگار (Biolife, Italy) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ent مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند (۴).

جهت استخراج DNA از کلنیهای سیاه رنگ که بر روی محیط نوترینت آگار خالص سازی شده بودند از روش جوشاندن بر اساس دستورالعمل پیشین رحیمی و همکاران استفاده گردید (۴). بر این اساس، یک کلنی باکتری در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و به خوبی ورتکس گردید. ویالها به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانده شدند و پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در g ×۱۳۰۰۰، مایع رویی به عنوان الگوی DNA در آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور شناسایی جنس انتروکوکوس از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ent بر اساس دستورالعمل و چرخه حرارتی که پیشتر معرفی شده بود استفاده گردید (۴) و پس از شناسایی و تأیید جنس انتروکوکوس، جهت شناسایی گونه های مختلف از آزمون multiplex-PCR با استفاده از دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۴). جهت بررسی وجود ژنهای vanA-vanG، از آزمون multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای

اختصاصی هر ژن و چرخه حرارتی که پیشتر توسط Depardieu و همکاران معرفی شده بودند، استفاده گردید (۹).
جهت انجام محاسبات آماری از نرم افزار GraphPad Prism 5 و آزمون آماری Fisher's exact استفاده گردید.

یافته ها

در مجموع ۳۷۴ کلنی سیاه رنگ مشکوک به جنس انتروکوکوس انتخاب گردید که این کلنیها پس از کشت و خالص سازی بر روی محیط نوترینت آگار و استخراج DNA، با آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ent شناسایی شدند، که در مجموع ۳۱۹ (۸۱ درصد) جدایه به عنوان انتروکوکوس تأیید شد. اختلاف فراوانی جدایه ها در هر دو فروشگاه در طی ماه های مهر($P <$۰/۰۰۵) و آبان($P <$۰/۰۰۷) معنی دار بود(جدول ۱).

جدول ۱. فراوانی جدایه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در فروشگاه های عرضه مرغ. اصفهان. ۱۳۹۸

زمان نمونه گیری	فروشگاه ۱ (٪)	فروشگاه ۲ (٪)	*P* VALUE	تعداد کلی (٪)
مهر ۹۸	(۴۰) ۶۸	(۲۱) ۳۱	۰/۰۰۵	(۳۱) ۹۹
آبان ۹۸	(۲۵) ۴۴	(۴۴) ۶۴	۰/۰۰۷	(۳۴) ۱۰۸
آذر ۹۸	(۳۵) ۶۰	(۳۵) ۵۲	۱	(۳۵) ۱۱۲
تعداد	(۵۴) ۱۷۲	(۴۶) ۱۴۷	۰/۳	۳۱۹

تمام ۳۱۹ جدایه مورد بررسی متعلق به گونه انتروکوکوس فیسیوم بودند و به عنوان سویه های مقاوم به ونکومایسین مورد مطالعه بیشتر قرار گرفتند.هیچکدام از سویه های انتروکوکوس فیسیوم واجد ژنهای vanC، vanE و vanG نبودند. در مقابل تمام ۳۱۹ جدایه انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین واجد ژنوتایپ vanA بوده، ۱۳ درصد (۴۱ سویه) نیز واجد ژنوتایپ vanB و ۱۵ سویه (۵ درصد) نیز واجد ژنوتایپ vanD بودند(جدول ۲). علاوه براین، ۱۵ سویه (۵ درصد) نیز واجد ژنوتایپ vanD بودند. فراوانی ژنوتایپهای vanB و vanD در نمونه های جمع آوری شده از فروشگاه شماره ۱ بیشتر از فروشگاه شماره ۲ بود، اما این اختلاف معنی دار نبود(جدول ۲).

جدول- فراوانی ژنوتایپهای مختلف در میان سویه های انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به ونکومایسین در فروشگاه های عرضه مرغ. اصفهان. ۱۳۹۸

ژنوتایپ	فروشگاه ۱ (٪)	فروشگاه ۲ (٪)	*P* VALUE	تعداد کلی (٪)
VANA	(۸۴) ۱۴۴	(۸۶) ۱۲۶	۰/۸	(۸۴) ۲۷۰
VANA, VANB	(۱۱) ۱۹	(۱۰) ۱۵	۱	(۱۱) ۳۴
VANA, VAND	(۲) ۳	(۳) ۵	۱	(۳) ۸
VANA, VANB, VAND	(۳) ۶	(۱) ۱	۰/۶	(۲) ۷
تعداد	(۵۴) ۱۷۲	(۴۶) ۱۴۷	۰/۳	۳۱۹

بحث

امروزه استفاده گسترده از آنتی بیوتیکها با افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی همراه شده است. آنتی بیوتیکها در درمان عفونتهای انسانی و دامی و همچنین به عنوان محرک رشد در خوراک دام مورد استفاده قرار می گیرند. در ایران نیز انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در میان باکتریهای بیماریزا در منابع مختلف بالینی، محیطی و دامی، به عنوان یک چالش مهم برای جامعه پزشکی مطرح شده است. در این مطالعه در طی سه ماهه سوم سال ۹۸ در مجموع ۱۲ نمونه گوشت مرغ بسته بندی (گوشت ران و گوشت سینه) از ۲ فروشگاه بسته بندی و عرضه مرغ در شهر اصفهان جمع آوری شدند. تمامی نمونه های جمع آوری شده آلوده به انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به ونکومایسین بودند. در مطالعه دیگری در شهر تهران در سال ۲۰۱۵ نیز طالبی و همکاران شیوع جدایه های انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به ونکومایسین را در نمونه های گوشت (ماکیان و گوشت قرمز) گزارش نمودند (۸). در استرالیا نیز در سال ۲۰۱۴ سویه های انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به ونکومایسین در میان نمونه های گوشت جداسازی شدند (۱۰). به طور کلی به نظر می رسد که حضور گونه های مختلف انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در گوشت می تواند ناشی از عوامل مختلفی باشد اما این اتفاق نظر وجود دارد که این امر احتمالا بیشتر ناشی از تماس مستقیم با انسان در مزارع پرورش دام و طیور، کشتارگاه ها و یا فروشندگان گوشت باشد (۷). بنابراین به نظر می رسد که آلوده شدن گوشت به انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین بیشتر ناشی از عدم رعایت اصول بهداشت است که با رعایت اصول بهداشتی قابل پیشگیری خواهد بود. به عنوان مثال، استفاده از دستکش توسط کارگران در دامداریها و مرغداریها، کشتارگاه ها و فروشگاه های عرضه می تواند به طور قابل توجهی از آلودگی گوشت به جدایه های مقاوم به ونکومایسین از طریق تماس مستقیم با انسان جلوگیری کند. علاوه بر این، کلونیزه شدن و انتشار وسیع جدایه های مقاوم به آنتی بیوتیک در کشتارگاه ها و در فروشگاه های عرضه گوشت نیز باعث آلودگی گوشت در طی فرآیند ذبح در کشتارگاه ها و در فرآیند بسته بندی می شوند. نگهداری گوشت در دمای بالا و عدم رعایت زنجیره سرد در فرآیند انتقال و عرضه گوشت نیز از عوامل خطر بسیار مهم در نظر گرفته می شوند (۱۱, ۱۲). در دو مطالعه دیگر نیز در تهران پیشتر به حضور جدایه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در نمونه های دامی و ماکیان اشاره شده است (۶, ۱۳). در آن مطالعات ۳ گونه فکالیس، فیسیوم و گالیناروم از نمونه های گوشتی و مدفوعی ماکیان و دامها جداسازی شدند. علاوه بر این، در بسیاری از مطالعات انجام گرفته در جهان نیز گونه های فکالیس و فیسیوم به صورت همزمان جداسازی شده اند. به عنوان مثال، در مطالعه Klein و همکاران در آلمان ۳۸ درصد جدایه ها متعلق به گونه فیسیوم، ۳۵ درصد متعلق به گونه فکالیس و مابقی مربوط به گونه ها دورانس، هایره و موندتی بودند (۱۴). اما در استرالیا فراوانی سویه های مقاوم به ونکومایسین تنها محدود به گونه فیسیوم بود (۱۰). تفاوت در فراوانی گونه های مختلف می تواند ناشی از نوع نمونه های مورد بررسی در مطالعات مختف، سطح بهداشتی دامداریها، مرغداریها و کشتارگاه ها و همچنین پرسنل شاغل در این مراکز باشد. علاوه بر این، با توجه به متفاوت بودن فراوانی گونه ها در میان افراد در کشورهای مختلف، این تفاوت در نمونه های گوشتی چندان هم عجیب نیست.

در این مطالعه تمامی جدایه های انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به ونکومایسین واجد ژنوتایپ vanA بودند. در سایر مطالعات انجام گرفته در ایران نیز، ژنوتایپ vanA از فراوانی ۱۰۰ درصد برخوردار بودند (۱, ۶-۴, ۸, ۱۳, ۱۷-۱۵). در استرالیا، آلمان و انگلستان نیز جدایه های واجد ژن vanA در میان نمونه های گوشت مرغ گزارش شده است (۱۰, ۱۴, ۱۸). علاوه بر این، در دو مطالعه در ایالات متحده نمونه های گوشت فاقد انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین بودند که مؤید عدم جداسازی جدایه های مقاوم به ونکومایسین در فرآورده های غذایی با منشاء حیوانی است (۱۹, ۲۰). در کشورهای اروپایی برخلاف ایالات متحده از آووپارسین به عنوان محرک رشد در غذای دام و طیور استفاده می شد که همین امر می تواند توجیه کننده حضور جدایه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در نمونه های گوشتی دام و طیور باشد. علاوه بر این، در این مطالعه ، نتایج مشابهی با کشورهای اروپایی حاصل شد که می تواند ناشی از شباهت جیره های غذایی در ایران و اروپا باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده شیوع بسیار بالای سویه های انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به ونکومایسین در نمونه های گوشت مرغ در شهر اصفهان است. بنابراین، به نظر می رسد که انتروکوکها نقش بسیار مهمی در آلودگی مواد غذایی مختلف با منشاء حیوانی می توانند ایفا نمایند. علاوه بر این، با توجه به جداسازی دائمی انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین در هر دو فروشگاه که نمونه های گوشت خود را همواره از یک کشتارگاه مشخص به ترتیب از شهرهای تهران و آمل تهیه می کنند به نظر می رسد که کلونهای مشخصی از انتروکوکوس فیسیوم مقاوم به ونکومایسین در مرغداریها، کشتارگاه ها و فروشگاه ها منتشر شده اند که نیازمند بررسیهای بیشتر جهت آگاهی پیدا کردن از منشاء آلودگی می باشد. با توجه به اینکه این مطالعه به صورت بسیار محدود و تنها بر روی نمونه های جمع آوری شده از دو فروشگاه در شهر اصفهان و در مدت ۳ ماه به انجام رسیده است، لذا انجام مطالعات گسترده تر در این زمینه کاملا ضروری به نظر می رسد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه
اصفهان به انجام رسیده است.

REFERENCE

1. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Möllby R, Pourshafie MR. Epidemiological link between wastewater and human vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. Current Microbiology. 2008;56(5):468-73.
2. Rubinstein E, Keynan Y. Vancomycin-resistant enterococci. Critical Care Clinics. 2013;29(4):841-52.
3. García-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. Clinical Microbiology Reviews. 2019;32(2):1-28.
4. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. Iranian Biomedical Journal. 2007;11(3):161-7.
5. Talebi M, Pourshafie MR, Katouli M, Möllby R. Molecular structure and transferability of Tn*1546*-like elements in *Enterococcus faecium* isolates from clinical, sewage, and surface water samples in Iran. Applied and Environmental Microbiology. 2008;74(5):1350-6.
6. Arbabi L, Bouzari M, Vanyousefi J, Rahimi F, Rahimi F. Isolation of vancomycin resistant enterococci from meat and fecal samples in Tehran chicken husbandries. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2010;15(48):33-8.
7. Rahimi F, Shafiei R. Characteristics of enterotoxin-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat in Tehran, Iran. Journal of Consumer Protection and Food Safety. 2019;14(4):389-98.
8. Talebi M, Sadeghi J, Rahimi F, Pourshafie MR. Isolation and biochemical fingerprinting of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from meat, chicken and cheese. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015;8(4):e15815.
9. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42(12):5857-60.
10. Zarfel G, Galler H, Luxner J, Petternel C, Reinthaler FF, Haas D, et al. Multiresistant bacteria isolated from chicken meat in Austria. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2014;11(12):12582-93.
11. Lozano C, Gharsa H, Ben Slama K, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* in animals and food: methicillin resistance, prevalence and population structure. A review in the African continent. Microorganisms. 2016;4(1):12.
12. Velasco V, Sherwood JS, Rojas-García PP, Logue CM. Multiplex real-time PCR for detection of *Staphylococcus aureus, mecA* and Panton-Valentine Leukocidin (PVL) genes from selective enrichments from animals and retail meat. PloS one. 2014;9(5):e97617.
13. Arbabi L, Vandyousefi J, Bouzari M, Rahimi F, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among vancomycin resistant enterococci isolated from meat and fecal samples in Tehran livestock husbandries. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2010;15(49):11-6.

14. Klein G, Pack A, Reuter G. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. Applied and Environmental Microbiology. 1998;64(5):1825-30.
15. Rahimi F, Saifi M, Pourshafei M, Soltan D, Ashraqhian M, Pourmand M. Investigation of clonality among high level gentamicin resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from sewage treatment plants in Tehran. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2008;13(3):Pe70-Pe82, En10.
16. Rahimi F, Torbabi M, Barahoei N. Isolation of vancomycin resistant enterococci from hospital sewage in Tehran. 2016 Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019;23(83):47-53.
17. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Kühn I, Möllby R, Eshraghi S, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcal species in sewage treatment plants in Iran. Water, Air, and Soil Pollution. 2007;185(1-4):111-9.
18. Kirk M, Hill R, Casewell M, Beighton D. Isolation of vancomycin-resistant enterococci from supermarket poultry. Streptococci and the Host: Springer; 1997. p. 289-91.
19. Thal L, Chow J, Mahayni R, Bonilla H, Perri M, Donabedian S, et al. Characterization of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995;39(9):2112-5.
20. Coque TM, Tomayko JF, Ricke SC, Okhyusen PC, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1996;40(11):2605-9.